

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Masanori NAKASU et al. **Mail Stop PCT**
Appl. No: : Not Yet Assigned (National Phase of PCT/JP2003/014174) **PCT Branch**
I. A. Filed : November 7, 2003
For : OSTEOGENIC TREATMENT DEVICE

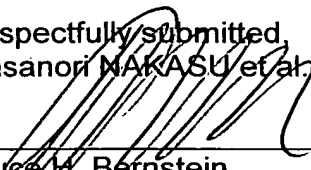
CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
U.S. Patent and Trademark Office
Customer Service Window, Mail Stop PCT
Randolph Building
401 Dulany Street
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application Nos. 2002-324371, filed November 7, 2002; and 2002-356079, filed December 6, 2002. The International Bureau already should have sent certified copies of the Japanese applications to the United States designated office. If the certified copies have not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
Arnold Turk Masanori NAKASU et al.
Reg. No. 33,094



Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

May 9, 2005
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

PCT/JP03/14174

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

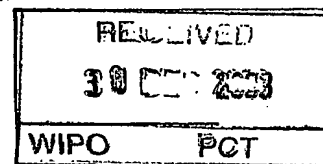
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月 7日

出願番号
Application Number: 特願2002-324371
[ST. 10/C]: [JP2002-324371]

出願人
Applicant(s): ペンタックス株式会社
小野 一郎

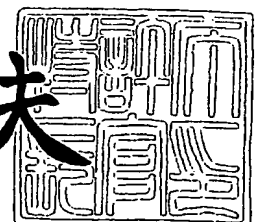
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003年12月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 14P230

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都板橋区前野町 2 丁目 3 6 番 9 号 ペンタックス株式会社内

 【氏名】 中須 正議

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市南区真駒内緑町 3 丁目 4 - 2 - 4 0 6

 【氏名】 小野 一郎

【特許出願人】

 【識別番号】 000000527

 【氏名又は名称】 ペンタックス株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 501317906

 【氏名又は名称】 小野 一郎

【代理人】

 【識別番号】 100091292

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 増田 達哉

 【電話番号】 3595-3251

【選任した代理人】

 【識別番号】 100091627

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 朝比 一夫

 【電話番号】 3595-3251

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007593

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0104391

【包括委任状番号】 0112022

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨形成治療デバイス

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子と、生体適合性を有する基体とを含むことを特徴とする骨形成治療デバイス。

【請求項 2】 前記血管形成誘導因子は、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、血管内皮増殖因子（VEGF）、肝細胞増殖因子（HGF）のうちの少なくとも 1 種である請求項 1 に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 3】 前記血管形成誘導因子と前記核酸との配合比は、重量比で 10：1～1：100 である請求項 1 または 2 に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 4】 前記骨形態形成タンパク質は、BMP-2、BMP-4、BMP-7 のうちの少なくとも 1 種である請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 5】 前記核酸は、発現プラスミド由来の塩基配列を含む請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 6】 前記核酸を、前記基体の体積 1 mL あたり 1～100 μ g となるよう用いる請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 7】 前記核酸を保持するベクターを含む請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 8】 前記ベクターは、非ウイルス由来のベクターである請求項 7 に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 9】 前記非ウイルス由来のベクターは、リポソームである請求項 8 に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 10】 前記リポソームは、正荷電リポソームである請求項 9 に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 11】 前記ベクターと前記核酸との配合比は、重量比で 1：1～20：1 である請求項 7 ないし 10 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 12】 前記基体は、ブロック体である請求項 1 ないし 11 のい

れかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 13】 前記基体は、多孔質体である請求項 1 ないし 12 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 14】 前記多孔質体の空孔率は、30～95%である請求項 13 に記載の骨形成治療デバイス。

【請求項 15】 前記基体は、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主としてなるものである請求項 1 ないし 14 のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、骨形成治療デバイスに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

医療の分野では、いわゆる人工骨、人工皮膚、人工臓器に対する研究が注目を集めており、これらについて、既に臨床の現場でも種々の立場から新たな挑戦が行われており、ここ数年技術的にも多大な伸展を示している。

【0003】

特に、同種移植に関しては、需要が供給を大きく上回る状態が慢性的に持続していることに加え、未知の感染症などの問題もある。

【0004】

これらを回避するため、このような同種組織の移植に代わるものとして、人工的に製造した人工組織・人工臓器の開発が待望されている。この点に関しては、骨移植においても同様である。

【0005】

骨の形成過程、修復過程について、多くの研究者によって解明され、その制御の要となる骨誘導因子の発見・同定・分離に加え、遺伝子工学的手法での骨誘導因子の生成が可能となり、その作用機序についての知見も集積されている。

【0006】

この骨誘導因子としては、Transforming Growth Factor b (TGFb) の super family に属する骨形態形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein: BMP) が多くの研究者の注目を集めている。この BMP は、皮下組織または筋組織内の未分化間葉系細胞に作用して、これを骨芽細胞や軟骨芽細胞に分化させ、骨または軟骨を形成させる活性タンパク質であり、その基礎的検討が開始されている。

【0007】

例えば、特許文献 1 には、BMP 自体または BMP をコードする DNA を、マトリックス材料 (基体) に担持 (適用) した移植体材料が開示されている。

【0008】

しかしながら、BMP はタンパク質であることから失活し易いという問題があり、大量を用いることが必要なことが明らかになっている。一方、BMP をコードする DNA を単独で用いても、十分な骨形成が効率よくなされないという問題がある。BMP をコードする DNA を単独で用いた場合に骨形成が効率よくなされない理由は、例えば、次のようなものであると推察される。すなわち、BMP をコードする DNA を用いることにより、良好に BMP が産生され、未分化間葉系細胞の骨芽細胞や軟骨芽細胞への分化が促進されたとしても、これらの分化した細胞が効率よく増殖できない結果、骨形成が促進されないのではないかということである。

【0009】

【特許文献 1】

特表 2001-505097 号公報

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、優れた骨形成能を有する骨形成治療デバイスを提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

このような目的は、下記 (1) ~ (15) の本発明により達成される。

【0012】

(1) 骨形態形成タンパク質 (BMP) をコードする塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子と、生体適合性を有する基体とを含むことを特徴とする骨形成治療デバイス。

【0013】

本発明によれば、優れた骨形成能を有する骨形成治療デバイスを提供することができる。

【0014】

(2) 前記血管形成誘導因子は、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) のうちの少なくとも1種である上記 (1) に記載の骨形成治療デバイス。

【0015】

これらのものは、血管形成能に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に、高い骨形成能を有するものとなる。

【0016】

(3) 前記血管形成誘導因子と前記核酸との配合比は、重量比で10:1～1:100である上記 (1) または (2) に記載の骨形成治療デバイス。

【0017】

これにより、新生血管が効率よく形成されるとともに、骨芽細胞が効率よく増殖し、骨形成が進行する。

【0018】

(4) 前記骨形態形成タンパク質は、BMP-2、BMP-4、BMP-7のうちの少なくとも1種である上記 (1) ないし (3) のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0019】

BMP-2、BMP-4、BMP-7は、特に、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導する作用に優れる。

【0020】

(5) 前記核酸は、発現プラスミド由来の塩基配列を含む上記 (1) ないし

(4) のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0021】

これにより、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞内における BMP の発現効率を、極めて高くすることができる。

【0022】

(6) 前記核酸を、前記基体の体積 1 mL あたり 1 ~ 100 μ g となるよう
用いる上記 (1) ないし (5) のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

これにより、より迅速な骨形成を促すことができる。

【0023】

(7) 前記核酸を保持するベクターを含む上記 (1) ないし (6) のいずれ
かに記載の骨形成治療デバイス。

【0024】

これにより、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みの効率が
より向上し、結果として、より迅速な骨形成が促される。

【0025】

(8) 前記ベクターは、非ウイルス由来のベクターである上記 (7) に記載
の骨形成治療デバイス。

【0026】

これにより、限局した部位に比較的大量の核酸を、容易かつ確実に供給するこ
とができ、また、患者のより高い安全性を確保することができる。

【0027】

(9) 前記非ウイルス由来のベクターは、リポソームである上記 (8) に記
載の骨形成治療デバイス。

【0028】

リポソームは、細胞膜の構成成分に近い成分で構成されるため、細胞膜への結
合（融合）が比較的容易かつ円滑になされ、核酸の未分化間葉系細胞、炎症細胞
、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞への取り込みの効率をより向上させ
ることができる。

【0029】

(10) 前記リポソームは、正荷電リポソームである上記(9)に記載の骨形成治療デバイス。

【0030】

正荷電リポソームは、その内部に核酸を封入する操作を必要としないことから、骨形成治療デバイスの作製時間の短縮に有利である。

【0031】

(11) 前記ベクターと前記核酸との配合比は、重量比で1:1~20:1である上記(7)ないし(10)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0032】

これにより、コストの増大や細胞毒性の発生を防止しつつ、核酸の未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞への取り込みの効率を十分に大きくすることができる。

【0033】

(12) 前記基体は、ブロック体である上記(1)ないし(11)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0034】

これにより、骨形成治療デバイスが早期に移植部位から散逸するのを防止することができるとともに、骨形成をブロック体の形状に沿って進行させることができる。

【0035】

(13) 前記基体は、多孔質体である上記(1)ないし(12)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0036】

これにより、核酸および血管形成誘導因子を、より容易かつ確実に基体に担持させることができるとともに、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞が基体内に侵入し易くなり、骨形成にとって有利である。

【0037】

(14) 前記多孔質体の空孔率は、30~95%である上記(13)に記載

の骨形成治療デバイス。

【0038】

これにより、基体の機械的強度を好適に維持しつつ、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞の基体内への侵入がさらに容易となり、基体をより好適な骨形成の場とすることができる。

【0039】

(15) 前記基体は、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主としてなるものである上記(1)ないし(14)のいずれかに記載の骨形成治療デバイス。

【0040】

ハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムは、骨の無機質主成分と同様の構造であるため、特に優れた生体適合性を有している。

【0041】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の骨形成治療デバイスについて詳細に説明する。

【0042】

本発明の骨形成治療デバイスは、骨形態形成タンパク質(BMP)をコードする塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子と、基体とを含むものであり、生体内に移植して骨形成治療を行うものである。

【0043】

本発明者は、上記問題点に鑑み、鋭意検討を重ねた結果、未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞や軟骨芽細胞を効率よく増殖させるためには、細胞の構築(形成)に必要な各種基質を供給する経路を確保すること、すなわち、骨芽細胞や軟骨芽細胞を誘導、増殖させる血管を、これらの周囲へ早期に形成させることが重要であるとの考えに至り、本発明を完成するに至った。

【0044】

本発明によれば、BMPをコードする塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子との併用による相乗効果により、未分化間葉系細胞の骨芽細胞や軟骨芽細胞へ

の分化を促進するとともに、これらの分化した細胞を効率よく増殖させ、その結果、骨形成を促進することができる。

【0045】

また、これらの分化した細胞（幹細胞）に、血管形成誘導因子自体が直接作用し、増殖させる効果も期待できる。

【0046】

ここで、本明細書中における「骨形成」とは、骨形成および軟骨形成の双方を含み、未分化間葉系細胞に対して骨芽細胞や軟骨芽細胞（以下、骨芽細胞で代表する）の分化を誘導することによる骨形成や軟骨形成のことを言う。

【0047】

また、「骨形成治療」とは、医科領域および歯科領域において、骨組織や軟骨組織の形成や補填を要する疾患の予防や治療を行うこと、あるいは、症状を改善させることを言う。

【0048】

また、BMPをコードする塩基配列としては、通常、cDNAが用いられるため、以下では、BMPをコードする塩基配列を、「BMP cDNA」と言う。

【0049】

本発明におけるBMPとしては、未分化間葉系細胞に対して骨芽細胞への分化を誘導することにより骨形成を促す活性を有するものであればよく、特に限定されないが、例えば、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP-12（以上、ホモダイマー）、もしくは、これらのBMPのヘテロダイマーまたは改変体（すなわち、天然に存在するBMPのアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換および／または付加されたアミノ酸配列を有し、かつ、天然に存在するBMPと同じ活性を有するタンパク質）等が挙げられる。これらの中でも、BMPとしては、特に、BMP-2、BMP-4、BMP-7のうちの少なくとも1種が好ましい。BMP-2、BMP-4、BMP-7は、特に、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導する作用に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に高い骨形成能を示す。

【0050】

このようなことから、本発明で用いる BMP cDNA としては、前述のような各種 BMP を産生（発現）し得る塩基配列を含むものであればよい。すなわち、BMP cDNA としては、天然に存在する BMP をコードする塩基配列と同一、または、天然に存在する BMP をコードする塩基配列において 1 以上の塩基が欠失、置換および／または付加されたものを用いることができる。また、これらのものは、1 種または 2 種以上を組み合わせる用いるようにしてもよい。

【0051】

このような BMP cDNA は、例えば、特表平 2-500241 号公報、特表平 3-503649 号公報、特表平 3-505098 号公報等に記載の方法に従って、入手することができる。

【0052】

また、このような核酸は、発現プラスミド由来の塩基配列を含むもの、すなわち、BMP cDNA を発現プラスミドに組み込んだ（導入した）ものであるのが好ましい。

【0053】

以下では、BMP cDNA を発現プラスミドに組み込んだものを、「組換えプラスミド」と言い、この組換えプラスミドを、BMP cDNA をコードする塩基配列を含む核酸の代表として説明する。

【0054】

このような組換えプラスミドを用いることにより、これを取り込んだ未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞等（以下、これらを総称して、「骨形成に関与する細胞」と言う。）内における BMP の発現効率を、極めて高くすることができる。

【0055】

発現プラスミドには、遺伝子組工学技術の分野で広く用いられるものの中から選択することができ、例えば、pCAH、pSC101、pBR322、pUC18 等の 1 種または 2 種以上を組み合わせる用いることができる。

【0056】

また、この組換えプラスミドには、適宜、BMPの発現を適切に制御する塩基配列（DNA断片）を導入することができる。

【0057】

発現プラスミドに、BMP cDNAを含む各種の塩基配列を組み込む方法には、公知の方法を用いることができる。

【0058】

ここで、図1に、組換えプラスミド（キメラDNA）の一例を示す。

図1に示す組換えプラスミドは、BMP-2 cDNAを、発現プラスミドであるpCAHに導入したものである。

【0059】

この組換えプラスミドは、Amp（アンピシリン）に耐性を示すDNA断片を含むとともに、サイトメガロウイルス（CMV）由来のエンハンサー・プロモーターを含むDNA断片と、BMP-2 cDNAの下流域には、SV40由来の転写終結信号を含むDNA断片とが組み込まれている。

【0060】

用いる組換えプラスミド（核酸）の量は、特に限定されないが、後述する基体の体積1mLあたり1～100 μ g程度であるのが好ましく、10～70 μ g程度であるのがより好ましい。用いる組換えプラスミドの量が少な過ぎると、迅速な骨形成を促すことができない場合がある。一方、用いる組換えプラスミドの量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めない。

【0061】

本発明における血管形成誘導因子としては、血管形成を促進し得るものであればよく、特に限定されないが、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic Fibroblast Growth Factor: bFGF）、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF）、肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor: HGF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor: GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（Granulocyte-Colony Stimulating Factor: G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（Macrophage-Colony Stimulating Factor: M-CSF）、幹細胞因子（St

em Cell Factor: SCF)、アンジオポエチン-1 (Angiopoietin-1)、アンジオポエチン-2 (Angiopoietin-2)、リポヌクレアーゼ類似タンパク質、ニコチンアミド、プロスタグランジンE (プロスタグランジンE₁、プロスタグランジンE₂、プロスタグランジンE₃)、プロリン誘導体、ディブチルサイクリックAMP (dbcAMP) のようなサイクリックAMP誘導体等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。これらの中でも、血管形成誘導因子としては、特に、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) のうちの少なくとも1種であるのが好ましい。これらのものは、血管形成能に優れるため、得られる骨形成治療デバイスは、特に、高い骨形成能を有するものとなる。

【0062】

用いる血管形成誘導因子の量は、その種類等により適宜設定され、特に限定されないが、血管形成誘導因子と組換えプラスミド (核酸) との配合比が、重量比で10:1~1:100程度であるのが好ましく、1:1~1:100程度であるのがより好ましい。用いる血管形成誘導因子の量が少な過ぎると、血管形成誘導因子の種類等によっては、新生血管が効率よく形成されず、骨芽細胞が十分に増殖できない場合がある。一方、用いる血管形成誘導因子の量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めない。

【0063】

また、本発明の骨形成治療デバイスは、生体適合性を有する基体を有している。この基体は、未分化間葉系細胞から分化した骨芽細胞による骨形成の場 (フィールド) となる。

【0064】

基体の形態は、ブロック体 (塊状物) が好適である。ブロック体 (例えば焼結体等) は、形状安定性を有しており、生体に骨形成治療デバイスを移植した際に、骨形成治療デバイスが早期に移植部位から散逸するのを防止することができるとともに、骨形成をブロック体の形状に沿って進行させることができるので、特に、移植部位が比較的大きな骨欠損部等である場合に有効である。

【0065】

なお、基体の形態は、骨形成治療デバイスの適用部位（移植部位）に応じて、適宜選択するようにすればよく、例えば、粉末状、顆粒状、ペレット状（小塊状）等であってもよい。このような形態の基体を用いる場合には、組換えプラスミド（核酸）および血管形成誘導因子と混合した組成物を、骨形成治療デバイスとすることができ、かかる骨形成治療デバイスを、骨欠損部に充填する（詰め込む）ようにして用いることができる。

【0066】

また、基体は、多孔質なもの（多孔質体）であるのが好ましい。基体として多孔質体を用いることにより、組換えプラスミド（核酸）および血管形成誘導因子を、より容易かつ確実に基体に担持させることができるとともに、骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞（例えば、血管内皮細胞等）が基体内に侵入し易くなり、骨形成にとって有利である。

【0067】

この場合、その空孔率は、特に限定されないが、30～95%程度であるのが好ましく、55～90%程度であるのがより好ましい。空孔率を前記範囲とすることにより、基体の機械的強度を好適に維持しつつ、骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞の基体内への侵入がさらに容易となり、基体をより好適な骨形成の場とすることができる。

【0068】

また、基体の構成材料としては、生体適合性を有するものであればよく、特に限定されないが、例えば、ハイドロキシアパタイト、フッ素アパタイト、炭酸アパタイト、リン酸二カルシウム、リン酸三カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸八カルシウムのようなリン酸カルシウム系化合物、アルミナ、チタニア、ジルコニア、イットリア等のセラミックス材料、チタンまたはチタン合金、ステンレス鋼、Co-Cr系合金、Ni-Ti系合金等の各種金属材料等が挙げられ、これらのうちの1種または2種以上を組み合わせる用いることができる。

【0069】

これらの中でも、基体の構成材料としては、リン酸カルシウム系化合物、アルミナ、ジルコニア等のセラミックス材料（いわゆる、バイオセラミックス）が好

ましく、特に、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主材料とするものが好ましい。

【0070】

ハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムは、骨の無機質主成分と同様の構造であるため、特に優れた生体適合性を有している。また、正負両荷電を有しているため、特に、ベクターとしてリポソームを用いる場合（この点については、後に詳述する）には、このリポソームを基体に長時間、安定的に担持させることができる。その結果、リポソームに吸着または封入された組換えプラスミド（核酸）も基体に長時間、安定的に保持されることになり、より迅速な骨形成に寄与する。また、骨芽細胞との親和性も高いことから新生骨を維持する上でも好ましい。

【0071】

このような基体は、種々の方法により作製（製造）することができる。基体として、セラミックス材料で構成される多孔質ブロック体を作製する場合を一例に説明すると、このような多孔質ブロック体は、例えば、セラミックス材料の粉体を含むスラリーを、骨欠損部等の移植部位に対応した形状に、例えば圧縮成形等により成形した成形体を得、かかる成形体を焼結（焼成）することによって作製することができる。

【0072】

以上のような骨形成治療デバイスは、組換えプラスミド（核酸）および血管形成誘導因子を基体に接触させることにより作製（製造）することができる。具体的には、骨形成治療デバイスは、例えば、組換えプラスミドおよび血管形成誘導因子のいずれか一方を含む液体（溶液または懸濁液）をそれぞれ、または、組換えプラスミドおよび血管形成誘導因子の双方を含む液体を基体に供給すること、あるいは、これらの液体に基体を浸漬すること等により、容易に作製することができる。

【0073】

なお、基体として、粉末状、顆粒状、ペレット状等のものを用いる場合には、例えば、基体とバインダーと前述したような液体とを混練した混練物を、成形す

ることにより骨形成治療デバイスを作製することもできる。

【0074】

このような骨形成治療デバイスを、例えば骨欠損部等の移植部位に埋設（適用）すると、この骨形成治療デバイスの近傍に存在する骨形成に関与する細胞が、その細胞内に組換えプラスミド（核酸）を取り込む。これらの細胞内では、組換えプラスミドを鋳型として順次BMPが産生され、このBMPにより、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化が誘導される。また、このとき、血管形成誘導因子の作用により、基体の内部（すなわち、骨芽細胞の周囲）に新生血管が活発に形成されており、この血管を介して骨芽細胞の増殖に必要な各種基質が供給される。これにより、骨芽細胞が効率よく増殖し、その結果、骨形成が進行する。

【0075】

さらに、このような骨形成治療デバイスは、ベクターを含むものが好ましい。このベクターは、組換えプラスミド（核酸）を保持し、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みを促進する機能を有するものである。ベクターを用いることにより、骨形成に関与する細胞への組換えプラスミドの取り込みの効率がより向上し、結果として、より迅速な骨形成が促される。

【0076】

ベクターとしては、ウィルス由来でないベクター（すなわち、非ウィルス由来のベクター）、アデノウィルスベクター、レトロウィルスベクターのようなウィルス由来のベクターのいずれを用いてもよいが、非ウィルス由来のベクターを用いるのが好ましい。非ウィルス由来のベクターを用いることにより、限局した部位に比較的大量の組換えプラスミドを、容易かつ確実に供給することができ、また、感染を起こさないことから患者のより高い安全性を確保することができるという利点もある。さらに、非ウィルス由来のベクターを用いる方法は、ウィルスベクターや細胞を用いる *ex vivo* 等の方法では、ウィルスベクターや細胞への核酸の導入操作、核酸を導入したウィルスベクターや細胞を増殖させる操作等が必要であるのに対し、これらの操作を必要としないことから、時間と手間とを低減できるという点においても優れている。

【0077】

非ウイルス由来のベクターとしては、種々のものを用いることができるが、リポソーム（脂質膜）を用いるのが好適である。リポソームは、細胞膜の構成成分に近い成分で構成されるため、細胞膜への結合（融合）が比較的容易かつ円滑になされる。このため、組換えプラスミドの骨形成に關与する細胞への取り込みの効率をより向上させることができる。

【0078】

リポソームとしては、例えば、表面に組換えプラスミドを吸着する形態の正荷電リポソーム、内部に組換えプラスミドを封入する形態の負荷電リポソーム等を用いることができる。これらのリポソームは、単独または組み合わせて用いることもできる。

【0079】

正荷電リポソームは、例えば、DOSPA (2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate) のようなポリカチオン性脂質を主としてなるものである。なお、正荷電リポソームとしては、例えば、QIAGEN社製の「SuperFect」等の市販品を用いることができる。

【0080】

一方、負荷電リポソームは、例えば、3-sn-ホスファチジルコリン、3-sn-ホスファチジルセリン、3-sn-ホスファチジルエタノールアミン、3-sn-ホスファチダールエタノールアミン、または、これらの誘導体のようなリン脂質を主としてなるものである。

【0081】

また、これらのリポソームには、例えばコレステロール等の脂質膜を安定化する添加剤を添加するようにしてもよい。

【0082】

なお、リポソームとしては、特に、正荷電リポソームを用いるのが好ましい。正荷電リポソームは、その内部に組換えプラスミドを封入する操作を必要としないことから、骨形成治療デバイスの作製時間の短縮に有利である。

【0083】

用いるベクターの量は、その種類等により適宜設定され、特に限定されないが、ベクターと組換えプラスミド（核酸）との配合比が、重量比で 1 : 1 ~ 20 : 1 程度であるのが好ましく、2 : 1 ~ 10 : 1 程度であるのがより好ましい。用いるベクターの量が少な過ぎると、ベクターの種類等によっては、組換えプラスミドの骨形成に関与する細胞への取り込みの効率を十分に大きくすることができない場合がある。一方、用いるベクターの量を前記上限値を超えて多くしても、それ以上の効果の増大が見込めないばかりでなく、細胞毒性が生じる場合がある。また、コストの増大を招き好ましくない。

【0084】

以上、本発明の骨形成治療デバイスの好適な実施形態について説明したが、本発明は、これに限定されるものではない。

【0085】

前記実施形態では、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸として、BMP cDNA を発現プラスミドに組み込んだ組換えプラスミドを代表に説明したが、本発明における BMP をコードする塩基配列を含む核酸としては、例えば、BMP cDNA（発現プラスミドに組み込まないもの）、BMP の mRNA、あるいは、これらに任意の塩基を付加したもの等であってもよい。

【0086】

【実施例】

次に、本発明の具体的実施例について説明する。

【0087】

（実施例）

1. 組換えプラスミドの調製

公知の方法により、ヒト BMP-2 cDNA（ヒト BMP-2 をコードする塩基配列）と、所望の塩基配列とを、発現プラスミドに組み込んで、図 1 に示すような組換えプラスミドを得た。

【0088】

そして、この組換えプラスミドを、次のようにして増殖させた。

まず、室温で、組換えプラスミドを、DH5 α (Competent Bacteria) の懸濁液 200 μ L に添加した。

【0089】

次に、この混合液を LB 寒天培地に添加して、37℃ \times 12 時間、培養した。

次に、この培養終了後、LB 寒天培地に増殖したコロニーの中から比較的大きいコロニーを選択し、これを Amp (アンピシリン) を含む LB 寒天培地に移植し、さらに 37℃ \times 12 時間、培養した。

【0090】

その後、Amp を含む LB 寒天培地で増殖した DH5 α の細胞膜を破壊し、その溶液から、組換えプラスミドを精製分離した。

【0091】

2. ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体 (基体) の製造

公知の湿式合成法によりハイドロキシアパタイトを合成し、ハイドロキシアパタイトスラリーを得た。

【0092】

このハイドロキシアパタイトスラリーを噴霧乾燥して平均粒径 15 μ m 程度の粉体を得た。その後、この粉体を 700℃ \times 2 時間、仮焼成した後、汎用粉碎装置を使用し、平均粒径 12 μ m 程度に粉碎した。粉碎したハイドロキシアパタイト粉体と水溶性高分子とを含む混合液を発泡させるために攪拌し、ペースト状とした。なお、ハイドロキシアパタイト粉体と水溶性高分子とは、重量比 5 : 6 で混合した。

【0093】

このペースト状混練物を型に入れて、水溶性高分子をゲル化させるため 80℃ で乾燥し、成形体を製造した。成型体を汎用旋盤等の加工機械を使用し直径 10 mm \times 厚さ 3 mm (体積: 約 0.24 mL) の円盤状に加工した。

【0094】

この円盤状成形体を 1200℃、大気中で 2 時間焼成し、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体を得た。

【0095】

なお、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体は、空孔率 70 %であった。この測定は、アルキメデス法により行った。

【0096】

3. 骨形成治療デバイスの作製

組換えプラスミドを含有するリン酸緩衝液と、血管形成誘導因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含有するリン酸緩衝液と、ベクターである正荷電リポソーム (QIAGEN社製、「Superfect」) を含有するリン酸緩衝液とを用意し、組換えプラスミドが $10\mu\text{g}$ 、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) $1\mu\text{g}$ 、正荷電リポソームが $40\mu\text{g}$ となるように、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体に含浸させた。

これにより、骨形成治療デバイスを得た。

【0097】

(比較例 1)

塩基性線維芽細胞増殖因子を用いない以外は、前記実施例と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

【0098】

(比較例 2)

組換えプラスミドおよび正荷電リポソームを用いない以外は、前記実施例と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

【0099】

(比較例 3)

組換えプラスミドおよび塩基性線維芽細胞増殖因子を用いない以外は、前記実施例と同様にして、骨形成治療デバイスを作製した。

【0100】

<評価>

1. 評価実験

72羽の家兎 (平均体重 3.0kg) を用意した。各家兎には、それぞれ、次のような手術を施した。

【0101】

まず、家兎に対して、25 mg/kg ペントバルビタールナトリウム（アボットラボラトリー社製、「ネンブタール」）を静脈内投与することにより麻酔した。

【0102】

次に、家兎の頭皮に切開を入れ、尾側を茎とする幅2.5 cm×長さ3.0 cmの皮弁として挙上した。

【0103】

次に、露出した骨膜に2～3 mmの切開を入れ、かかる部分に骨膜剥離子を当てて、直径約3 mmの部分を剥離して頭蓋骨を露出させた。

【0104】

次に、露出した頭蓋骨の正中付近を、頭蓋骨穿頭器を用いて開頭し、硬膜は温存するように、その直上まで頭蓋骨を除去した後、完全に止血した。なお、頭蓋骨の厚さは約3 mmであり、開頭部分の直径は約1.2 cmとした。

【0105】

次に、開頭を行った家兎を18羽ずつの計4群に分け、第1群の各家兎には、それぞれ、実施例の骨形成治療デバイスを、第2群の各家兎には、それぞれ、比較例1の骨形成治療デバイスを、第3群の各家兎には、それぞれ、比較例2の骨形成治療デバイスを、また、第4群の各家兎には、それぞれ、比較例3の骨形成治療デバイスを移植した後、皮弁を元の位置へ戻して縫合した。

【0106】

そして、手術が行われた各家兎を、それぞれ、個別のケージに入れて飼育した。

【0107】

2. 評価結果

手術後3、6、9週目に、それぞれ、各群の家兎を6羽ずつ、前記同様の麻酔薬を過量投与することにより屠殺した。

【0108】

その後、頭蓋骨を直上の皮膚とともに一塊として切除し、採取した組織を直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に浸して固定した後、ポリエステル樹脂に埋入し

た。次に、このポリエステル樹脂に埋入した組織を、厚さ $50\mu\text{m}$ となるように薄切研磨した後、c o l e - H E 染色を行った。これにより、組織標本を得た。

【0109】

得られた各組織標本について、それぞれ、次のようにして骨形成率を測定した。すなわち、各組織標本を、それぞれ、デジタルカメラ (DP-12) 付き実体顕微鏡システム SZX-12 (オリンパス社製) で撮影した。次に、p h o t o s h o p _ v e r 4 . 0 (アドビ社製) を使用し、撮影した画像データから新生骨部分をデジタル処理により抽出し、さらに S C I O N イメージ (S c i o n 社製) を用いて、画像解析の手法により前記抽出された新生骨部分の面積を計測数値化して骨形成率を求めた。

【0110】

なお、骨形成率の測定は、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の面方向 (厚さ方向に垂直な方向) の端部から $5\text{mm} \times$ ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体の厚さ 3mm の範囲について行った。

この結果を表1に示す。

【0111】

【表 1】

表 1

	骨形成治療デバイス	評価結果		
		骨形成率 (%)		
		3 週間後	6 週間後	9 週間後
実施例	組換えプラスミド 塩基性線維芽細胞増殖因子 正荷電リポソーム HAp 多孔質焼結体	5.3±2.2	18.0±9.7	42.0±10.5
比較例 1	組換えプラスミド 正荷電リポソーム HAp 多孔質焼結体	14.1±7.5	18.5±4.9	29.2±10.1
比較例 2	塩基性線維芽細胞増殖因子 HAp 多孔質焼結体	3.2±3.2	19.5±1.4	31.0±9.6
比較例 3	正荷電リポソーム HAp 多孔質焼結体	7.7±3.4	9.0±8.0	12.7±7.6

HAp: ハイドロキシアパタイト

【0112】

表 1 に示すように、実施例の骨形成治療デバイス（本発明の骨形成治療デバイ

ス)の骨形成率は、比較例1～比較例3の骨形成治療デバイスの骨形成率と比較して、3週間後および6週間後では同等もしくは低いものもあったが、9週間後には、いずれのものよりも顕著に高くなった。

【0113】

このように、組換えプラスミドと塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)とを併用することにより、極めて優れた骨形成能を有する骨形成治療デバイスが得られることが明らかとなった。

【0114】

また、基体として、ハイドロキシアパタイト多孔質焼結体に代わり、リン酸三カルシウム多孔質焼結体を用いて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記とほぼ同様の評価結果が得られた。

【0115】

また、BMPをコードする塩基配列として、ヒトBMP-2をコードする塩基配列に代わり、ヒトBMP-1、ヒトBMP-2、ヒトBMP-3、ヒトBMP-4、ヒトBMP-5、ヒトBMP-6、ヒトBMP-7、ヒトBMP-8、ヒトBMP-9またはヒトBMP-12をコードする塩基配列、あるいは、これらを任意に組み合わせて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記実施例とほぼ同様の評価結果が得られた。

【0116】

また、血管形成誘導因子として、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)に代わり、血管内皮増殖因子(VEGF)または肝細胞増殖因子(HGF)、あるいは、これらを任意に組み合わせて骨形成治療デバイスを作製して、前記と同様の評価実験を行った結果、前記実施例とほぼ同様の評価結果が得られた。

【0117】

【発明の効果】

以上述べたように、本発明によれば、極めて迅速な骨形成を可能とし、早期の骨形成治療に貢献することができる。

【0118】

特に、本発明では、血管形成誘導因子を併用することにより、骨芽細胞の周囲

に新生血管が活発に形成され、骨芽細胞が効率よく増殖して、その結果、迅速な骨形成がなされる。

【0119】

このため、各種骨形成治療に際し、遊離骨移植を行う必要がなくなり、採骨部が不要となることから、より安全かつ確実で、合理的な手術が可能となる。

【0120】

このようなことから、手術時間や入院期間の短縮を図ることができ、トータルの医療コストの削減、治療クオリティーの向上、患者のQOLの向上を図ることができる。

【0121】

また、核酸を保持するベクターを併用することにより、未分化間葉系細胞、炎症細胞、線維芽細胞のような骨形成に関与する細胞内への核酸の取り込みの効率が向上して、結果として、より迅速な骨形成がなされ、前記効果がより向上する。

【0122】

また、基体としてブロック体を用いることにより、基体の形状に沿って骨形成が良好に進行するので、移植部位が比較的大きな骨欠損部等である場合に有効である。

【0123】

また、基体として、遺伝子治療に特化した多孔質体を用いることにより、核酸および血管形成誘導因子を、より容易かつ確実に基体に担持させることができるとともに、各種の骨形成に関与する細胞や血管形成に関与する細胞が基体内に侵入し易くなり、骨形成にとって有利である。

【0124】

また、本発明の骨形成治療デバイスは、保存、取扱いや手術時の加工等が容易である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

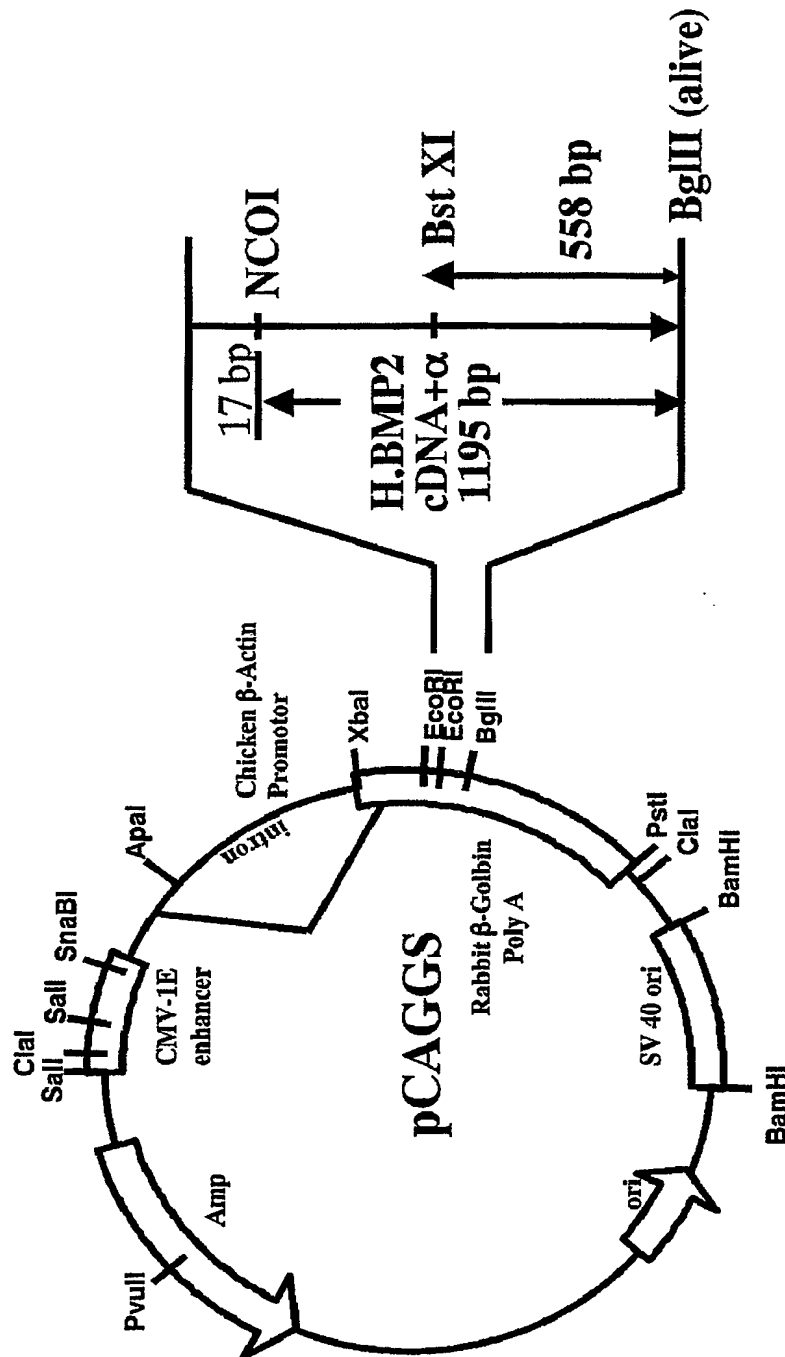
組換えプラスミドの一例を示す遺伝子地図である。

【書類名】

図面

【図 1】

**pCAH.BMP2
(5910 bp)**



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れた骨形成能を有する骨形成治療デバイスを提供すること。

【解決手段】 本発明の骨形成治療デバイスは、骨形態形成タンパク質（BMP）をコードする塩基配列を含む核酸と、血管形成誘導因子と、基体とを含むものであり、生体内に移植して骨形成治療を行うものである。骨形態形成タンパク質は、BMP-2、4、7のうちの少なくとも1種、核酸は、発現プラスミド由来の塩基配列を含むものが好ましい。血管形成誘導因子は、塩基性線維芽細胞増殖因子、血管内皮増殖因子、肝細胞増殖因子のうちの少なくとも1種が好ましい。基体の形態は、ブロック体が好ましく、特に空孔率が30～95%の多孔質体が好ましい。基体の構成材料は、ハイドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムを主とするものが好ましい。さらに、核酸を保持するベクターを含むものが好ましく、このベクターは、非ウイルス由来のベクターである正荷電リポソームが好ましい。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 2 4 3 7 1
受付番号	5 0 2 0 1 6 8 5 2 7 1
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 1 1 月 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成14年11月 7日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 2 - 3 2 4 3 7 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 5 2 7]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都板橋区前野町 2 丁目 3 6 番 9 号

氏 名

ペンタックス株式会社

特願 2 0 0 2 - 3 2 4 3 7 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 1 3 1 7 9 0 6]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 8 月 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

北海道札幌市南区真駒内緑町 3 丁目 4 - 2 - 4 0 6

氏 名

小野 一郎